

III. METODE PELAKSANAAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan yaitu pada bulan Maret 2019 s/d. bulan Juli 2019. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang Jl. Raya Tlogomas No. 246, Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *beaker glass*, gelas ukur, corong kaca, pH meter, spatula, *microwave*, botol kultur, pipet ukur, pipet tetes, *aluminium foil*, erlenmeyer, plastik, karet, tisu, kertas label, kertas saring, masker, karet hisap, agar dispenser, *freezer*, autoklaf, timbangan analitik, *bunsen burner*, *hand sprayer*, LAF (*Laminar Air Flow*), pinset, *scalpel*, gunting, plastik *warp*, penggaris, dan alat tulis.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi eksplan tanaman kentang varietas Granola Kembang. Media MS yang terdiri dari unsur hara makro, mikro, vitamin, sukrosa, dan agar, aquades, spirtus, alkohol 85%, NaCl sebagai agen seleksi toleran salinitas.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan melalui dua tahap yaitu penentuan LD50 untuk toksisitas NaCl pada tanaman kentang kemudian melakukan seleksi terhadap eksplan tanaman kentang yang toleran terhadap salinitas

3.3.1 Penentuan *lethal dosis* 50 (LD50)

Penentuan *Lethal dosis* 50 (LD50) menggunakan beberapa konsentrasi

NaCl antara lain:

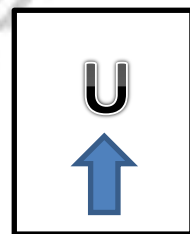
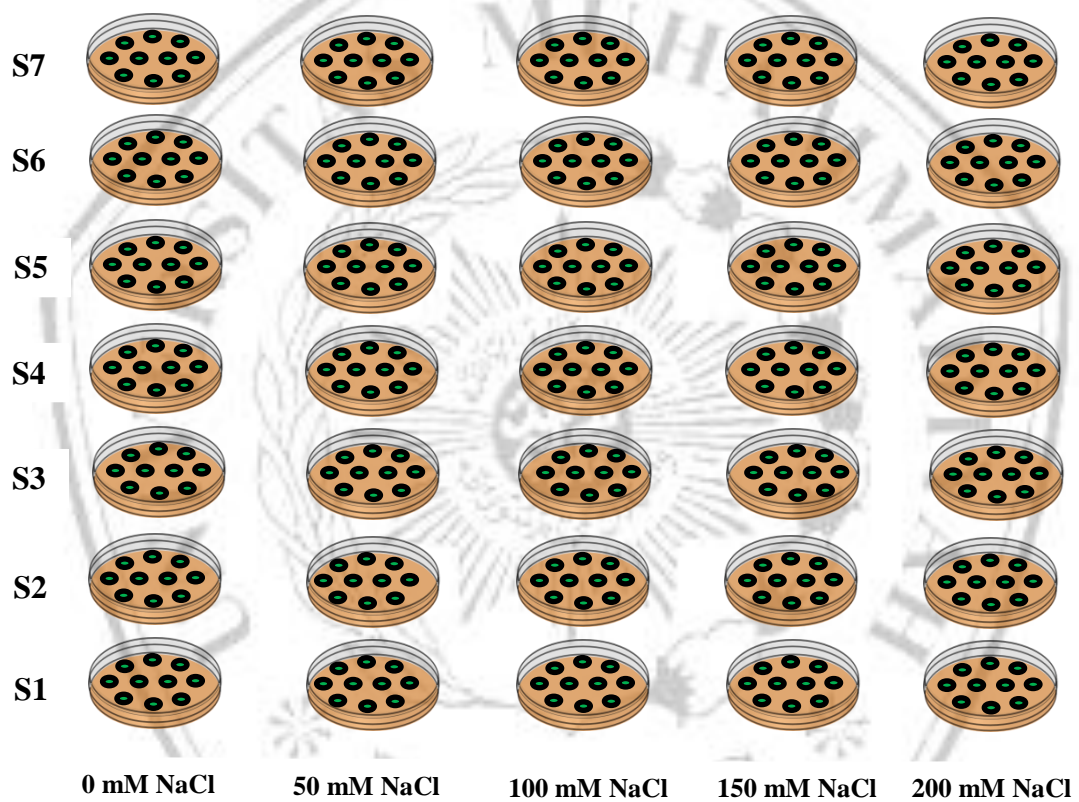
P0 = 0 mM NaCl

P1 = 50 mM NaCl

P2 = 100 mM NaCl

P3 = 150 mM NaCl

P4 = 200 mM NaCl



Gambar 1. Denah Perlakuan Penentuan LD50

Penentuan LD50 ini bertujuan untuk mengetahui *lethal dosis* NaCl yang sesuai untuk tahap selanjutnya yaitu seleksi eksplan. Penelitian mengenai konsentrasi LD50 untuk seleksi tanaman kentang menggunakan NaCl belum pernah dilakukan, sehingga acuan konsentrasi yang digunakan adalah berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan namun bukan untuk menentukan nilai LD50.

Penentuan konsentrasi NaCl pada penelitian ini didasarkan pada beberapa percobaan dari pengaruh salinitas terhadap tanaman kentang yang telah dilakukan sebelumnya. Penelitian Rahman *et al.* (2008) di Bangladesh menunjukkan bahwa terdapat perbedaan respons tanaman kentang yang diberi cekaman salinitas yaitu dengan penambahan NaCl pada medium kultur secara *in vitro*. Parameter yang diamati pada penelitian adalah pertumbuhan tanaman kentang seperti bobot segar per planlet, tinggi pucuk, dan multiplikasi pucuk pada tiga kultivar kentang asal Bangladesh yaitu Atlanta, Shibilaty dan Sherpody dengan penambahan konsentrasi NaCl 0, 25, 50, 75 dan 100 mM. Hasil dari penelitian tersebut pada konsentrasi NaCl 25 mM, tidak terdapat perbedaan respons yang nyata terhadap parameter pertumbuhan tanaman kentang dan pada konsentrasi NaCl 100 mM, tanaman tetap bisa bertahan hidup akan tetapi pertumbuhan tanaman terganggu. Oleh karena itu konsentrasi NaCl 25 mM tidak digunakan lagi akan tetapi menggunakan konsentrasi yang lebih besar yaitu konsentrasi NaCl 150 mM.

Penentuan LD50 dilakukan di dalam botol kultur jenis selai. Setiap botol petri diisi 10 buku eksplan kentang dengan menggunakan media MS dan penambahan berbagai konsentrasi NaCl antara lain 0 mM (kontrol), 50 mM, 100 mM, 150 mM dan 200 mM. Setiap perlakuan berjumlah 8 sampel botol. Sehingga

total keseluruhan sampel adalah 40 botol dan total eksplan yang dibutuhkan sejumlah 400 eksplan.

Parameter yang diamati yaitu persentase eksplan hidup dan presentasi eksplan mati dari masing-masing perlakuan. Penentuan LD50 ini diamati sampai lebih dari 50% tanaman mati dalam konsentrasi *lethal*. Konsentrasi tersebut kemudian digunakan untuk menyeleksi eksplan kentang terhadap cekaman salinitas.

3.3.2 Seleksi Planlet menggunakan Berbagai Konsentrasi NaCl

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan faktornya adalah perbedaan konsentrasi. Adapun rinciannya adalah sebagai berikut:

P0 = media MS + 0 mM NaCl

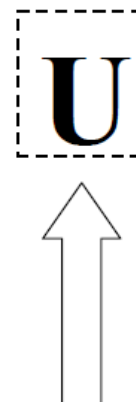
P1 = media MS + 75 mM NaCl

P2 = media MS + 100 mM NaCl

P3 = media MS + 125 mM NaCl

Unit percobaan terdiri atas 4 perlakuan yang diulang sebanyak 5 kali dengan 5 klum kalus di setiap botolnya. Setiap perlakuan/botol memiliki sampel cadangan sebanyak 1 botol dan sampel utama sebanyak 4 botol. Total botol kultur yang digunakan dari rincian tersebut yaitu 100 botol.

P0U1S1	P3U3S2	P2U2S3	P0U5S4	P3U5S5
P2U2S1	P2U2S2	P3U3S3	P2U2S4	P0U5S5
P1U1S1	P1U1S2	P0U5S3	P3U1S4	P3U1S5
P3U1S1	P3U5S2	P3U4S3	P0U2S4	P0U1S5
P1U4S1	P0U1S2	P1U1S3	P2U5S4	P2U2S5
P2U3S1	P3U1S2	P3U1S3	P3U3S4	P3U3S5
P1U5S1	P1U4S2	P1U4S3	P1U1S4	P0U2S5
P0U2S1	P2U3S2	P0U1S3	P2U1S4	P2U1S5
P3U3S1	P0U3S2	P2U3S3	P1U4S4	P3U4S5
P2U5S1	P2U5S2	P0U3S3	P3U4S4	P0U4S5
P0U3S1	P0U2S2	P2U1S3	P0U3S4	P1U4S5
P3U5S1	P2U1S2	P0U2S3	P2U3S4	P2U4S5
P1U2S1	P1U2S2	P3U5S3	P1U2S4	P1U1S5
P2U1S1	P1U5S2	P2U5S3	P2U4S4	P2U5S5
P3U2S1	P0U5S2	P1U2S3	P1U3S4	P0U3S5
P0U4S1	P2U4S2	P3U2S3	P0U1S4	P2U3S5
P2U4S1	P0U4S2	P1U3S3	P3U5Q4	P1U2S5
P3U4S1	P3U2S2	P2U4S3	P0U4S4	P1U5S5
P0U5S1	P1U3S2	P0U4S3	P1U5S4	P3U2S5
P1U3S1	P3U4S2	P1U5S3	P3U2S4	P1U3S5



Gambar 2. Denah percobaan seleksi cekaman salinitas

Keterangan: Media MS tanpa NaCl (P0); Media MS+75 mM NaCl (P1); Media MS+100 mM NaCl (P2); Media MS+125 mM NaCl (P3)

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana yang menggunakan empat macam konsentrasi NaCl dengan jumlah sampel per perlakuan sebanyak 5 botol (4 sampel utama, 1 sampel cadangan), dimana dalam setiap sampel botol berisi 5 planlet. Total sampel botol per ulangan yakni 20 botol kultur yang kemudian diulang sebanyak 5 kali. Jarak antara botol kultur sebesar 10x10 cm. Rak kultur yang digunakan adalah rak vertical dengan panjang rak 160 cm dan lebar 60 cm.

Data penelitian dianalisis menggunakan analisis ragam, untuk mengetahui berpengaruh atau tidaknya perlakuan dengan menggunakan uji F. Apabila data yang diperoleh berpengaruh nyata, maka untuk mengetahui perbedaan diantara

rata-rata perlakuan dilakukan uji BNJ pada taraf $\alpha = 5\%$. Data disajikan dalam bentuk dan gambar.

3.4 Tahapan Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap yaitu tahap persiapan, tahap inti, dan inkubasi.

3.4.1 Persiapan

Tahap persiapan dilakukan dalam beberapa metode yaitu sterilisasi alat dan bahan, dan persiapan bahan tanam.

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat logam dan gelas yang akan digunakan dalam kegiatan kultur disterilkan menggunakan autoclave pada temperatur 121°C dan tekanan 1 atm dalam kurun waktu 60 menit, sedangkan sterilisasi bahan atau media kultur selama 10 menit. Botol-botol yang akan disterilisasi sebelumnya ditutup dengan aluminium foil atau plastik dan diikat dengan karet.

Ketika akan melakukan inokulasi, alat untuk inokulasi seperti pinset dan *scalpel* dilakukan dengan pembakaran di atas api bunsen di dalam LAF. Aquadest disterilkan seperti sterilisasi alat selama 60 menit

b. Persiapan Bahan Tanam

Penelitian ini menggunakan eksplan kentang varietas Granola Kembang. Eksplan yang digunakan adalah eksplan tanaman kentang yang memiliki kondisi sehat dan bebas dari penyakit maupun jamur. Eksplan ini diperoleh dari Laboratorium Kultur *In Vitro* Universitas Muhammadiyah Malang

3.4.2 Penelitian Inti

a. Penentuan *Lethal Dose 50* (LD50) Senyawa NaCl pada Planlet Kentang

Penentuan LD50 dilakukan dengan cara mencari sumber terkait mengenai dosis lethal senyawa NaCl terhadap kentang. *Lethal Dose 50* adalah suatu besaran yang diturunkan secara statistik, guna menyatakan dosis tunggal suatu senyawa yang diperkirakan dapat mematikan atau menimbulkan efek toksik sebanyak 50%.

Pada penentuan LD50 senyawa NaCl terhadap planlet kentang varietas Granola Kembang ini menggunakan media MS cair (tanpa penambahan agar)

Tabel 1. Komposisi Media *Murishage and Skoog* (MS)

Hara	Senyawa	Mg/L
Makro	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Mikro	FESO ₄ ·7h ₂ O	278
	Na ₂ EDTA	37,3
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,03
	CoCl ₂ ·2H ₂ O	0,03
Vitamin	Myoinositol	100
	Niacin	0,5
	Pyridoxine-HCl	0,5
	Thiamin-HCl	0,1
	Glycine	2,0
Sumber karbon	Sukrosa	300.000
Bahan pematat	Bacto agar	8000

Media MS yang telah dibuat dibagi menjadi 5 bagian dengan menambahkan beberapa konsentrasi NaCl antara lain 0, 50, 100, 150 dan 200 mM. Media tersebut kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 Psi selama ±10 menit pada suhu 121°C. Setelah disterilisasi kemudian medium yang

telah dibuat dimasukkan pada botol kultur sesuai dengan perlakuan dengan kertas saring berukuran 5 cm x 5 cm sebagai alasnya. Tujuannya adalah agar media cair dalam botol dapat terserap oleh kertas saring, sehingga tanaman dapat memperoleh nutrisi dengan baik. Kemudian media tersebut didiamkan di dalam ruang kultur selama tiga hari sebelum ditanami dengan eksplan kentang secara aseptik.

Penanaman eksplan kentang dilakukan di dalam LAF dengan cara memotong eksplan menjadi beberapa bagian berukuran ± 1 cm kemudian menanam potongan-potongan eksplan tersebut pada media kultur menggunakan pinset. Satu botol kultur diisi 10 eksplan. Selama penanaman, mulut botol harus selalu dekat dengan api untuk menghindari kontaminasi. Pinset yang telah digunakan kemudian dibakar di atas bunsen untuk menjaga kesterilannya.

Penentuan LD50 ini diamati sampai lebih dari 50% tanaman mati dalam konsentrasi *lethal*. Media yang menunjukkan *lethal dosis* paling tepat selanjutnya digunakan dalam seleksi eksplan kentang menggunakan NaCl

b. Seleksi Planlet dengan menggunakan Berbagai Macam Konsentrasi NaCl

Medium yang digunakan untuk seleksi adalah media MS dengan berbagai konsentrasi NaCl (0, 75, 100, dan 125 mM).

Botol-botol disterilisasi di dalam autoklaf selama ± 60 menit pada suhu 121°C. Botol kultur yang digunakan memiliki diameter 5,5 cm dan tinggi 13 cm. Eksplan ditanam pada media yang telah dibuat sesuai dengan perlakuan. Setiap botol berisi 5 eksplan. Botol yang berisi eksplan tersebut ditutup kembali dengan plastik dan dilapisi *plastic wrap*. Eksplan yang sudah disub kultur diletakkan pada rak di ruang kultur.

3.4.3 Inkubasi

Botol kultur yang telah ditanami kemudian diletakkan di rak inkubasi dan diatur sesuai rancangan perlakuan yang ada. Suhu ruang inkubasi kultur antara 24-27°C dan kelembaban berkisar 70% (Zulkarnain, 2009).

3.4.4 Parameter Pengamatan.

a. Waktu muncul tunas pertama

Waktu muncul tunas pertama dilakukan setiap hari secara visual setelah tanam sampai muncul tunas pertama.

b. Persentase eksplan hidup (%)

Persentase eksplan hidup dihitung dari banyaknya eksplan yang bertahan hidup pada hari terakhir pengamatan di setiap perlakuan dan dinyatakan dalam bentuk persen untuk melihat daya adaptasi dari media yang diberikan, dengan menggunakan rumus:

$$\begin{aligned} \text{Persentase eksplan hidup} \\ = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\% \end{aligned}$$

(Nurcahyani dkk., 2014).

c. Persentase eksplan mati (%)

Persentase eksplan mati dihitung dari banyaknya eksplan yang mati dalam satuan persen pada setiap perlakuan dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan mati} = \frac{\text{Jumlah eksplan mati}}{\text{Jumlah total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

(Nurcahyani dkk., 2014).

d. Tinggi planlet

Tinggi planlet dihitung dengan menggunakan penggaris dalam satuan centimeter setiap minggunya. Tujuan pengamatan ini yaitu untuk mengetahui pengaruh masing-masing perlakuan terhadap tinggi planlet.

e. Jumlah daun

Pengamatan jumlah daun dihitung setiap 6 hari sekali dengan menghitung jumlah daun yang muncul pada setiap perlakuan.

f. Jumlah akar

Pengamatan jumlah akar dilakukan setiap 6 hari sekali dengan menghitung jumlah akar yang muncul pada setiap perlakuan.

g. Jumlah ruas

Pengamatan jumlah ruas dilakukan setiap 6 hari sekali dengan menghitung jumlah ruas yang muncul pada setiap perlakuan.

h. Bobot Segar per Planlet

Bobot segar per planlet dilakukan pada saat fase akhir penelitian dengan cara menimbang 5 planlet yang berasal dari 1 sampel menggunakan timbangan analitik, kemudian hasil dari penimbangan dibagi 5.

i. Bobot kering per planlet

Parameter bobot kering per planlet dilakukan pada saat fase akhir penelitian dengan menggunakan oven. Pengambilan data dilakukan dengan cara menimbang sampel yang berisi 5 planlet kering menggunakan

timbangan analitik, kemudian hasil dari penimbangan dikurangi berat kertas dan dibagi 5.

j. Klorofil

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung klorofil a, b dan total dengan rumus Arnon (1949) dengan membandingkan OD pada 663 nm dan 646 nm dalam sel yang tebalnya 1 cm dengan menggunakan koefisien absorpsi spesifik yang telah ditentukan oleh Mac Kinner (1941) sebagai berikut:

$$\text{Klorofil total } \left(\frac{mg}{l} \right) = 17,3 D_{646} + 7,18 D_{663}$$

$$\text{Klorofil a } \left(\frac{mg}{l} \right) = 12,21 D_{663} + 2,81 D_{646}$$

$$\text{Klorofil b } \left(\frac{mg}{l} \right) = 20,13 D_{646} + 5,03 D_{663}$$

k. Stomata

Pengamatan stomata dilakukan dengan cara mengamati daun pada setiap sampel tanaman secara mikroskopis. Pengamatan tersebut meliputi pengamatan terhadap jumlah stomata per satuan luas, panjang stomata, lebar stomata, dan lebar celah stomata.

l. Vigor tanaman

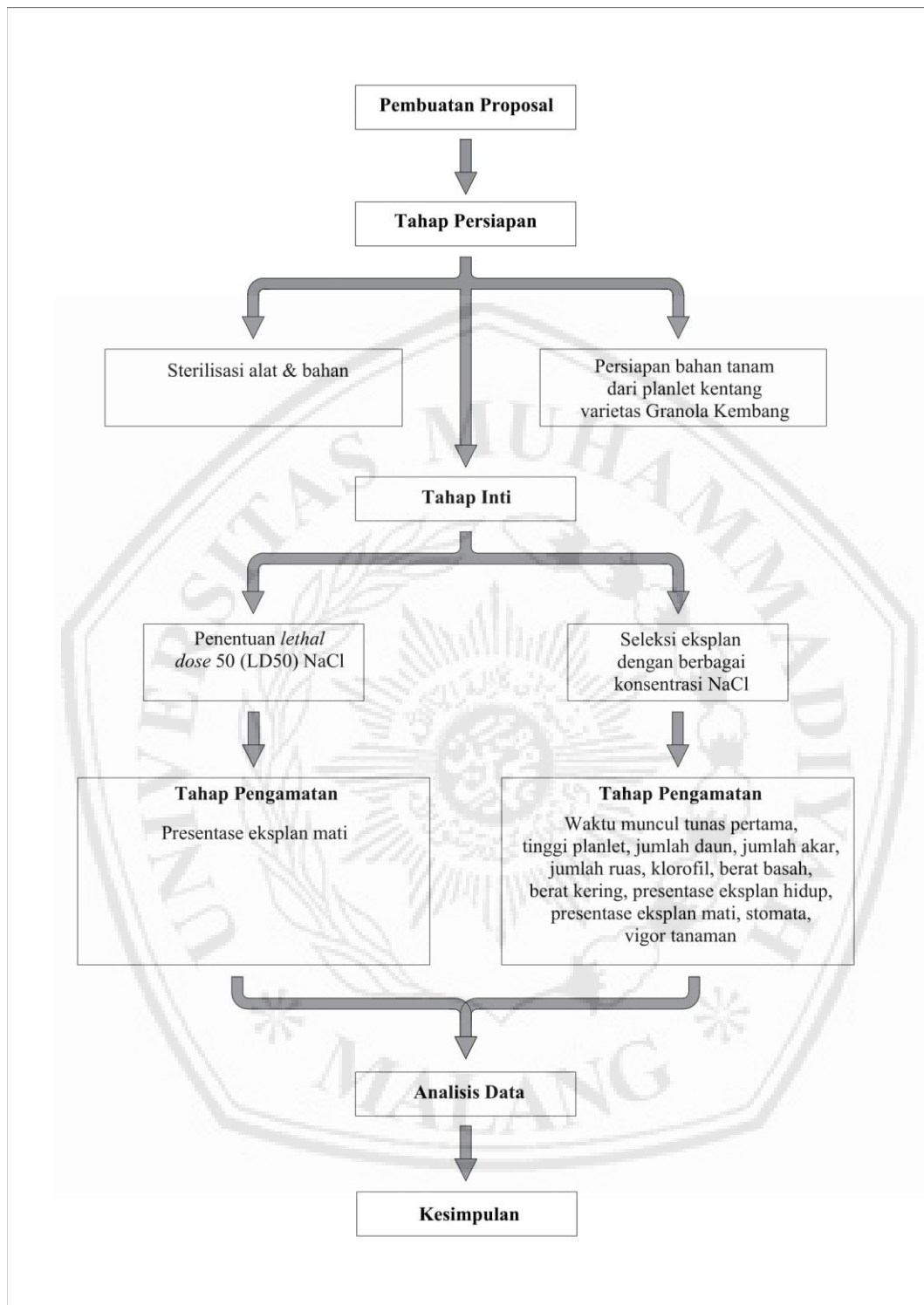
Pengamatan dilakukan pada saat tanaman memasuki minggu akhir penelitian. Vigor planlet dibedakan dengan cara mengklasifikasikan planlet yang termasuk dalam kelompok vigor lemah, tegar, dan sangat tegar. Tujuannya yaitu untuk mengetahui perbedaan dan keadaan vigor tanaman dari masing-masing perlakuan

3.4.5 Analisis Data

Data penelitian dianalisis menggunakan analisis ragam, untuk mengetahui berpengaruh atau tidaknya perlakuan dengan menggunakan uji F. Apabila data yang diperoleh berpengaruh nyata, maka untuk mengetahui perbedaan diantara rata-rata perlakuan dilakukan uji BNJ pada taraf $\alpha = 5\%$. Data disajikan dalam bentuk dan gambar.



3.4.5 Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian